

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-176753

(43)Date of publication of application : 20.07.1993

BEST AVAILABLE COPY

(51)Int.Cl.

C12M 3/00
C12N 5/06

(21)Application number : 03-357910

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 26.12.1991

(72)Inventor : AKAIKE TOSHIHIRO
TOBE SEISHIROU
MIYAMOTO SHIGEYUKI
OOHASHI AKIKIMI

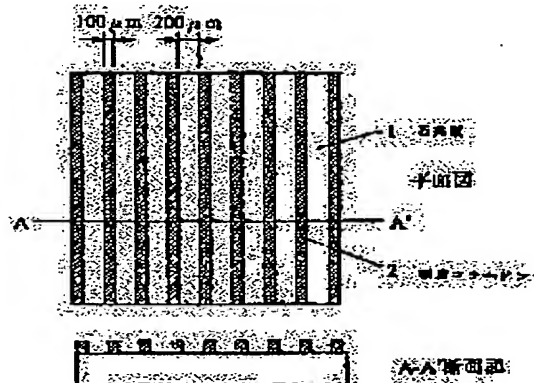
(54) SUBSTRATE FOR CELL CULTURE AND METHOD FOR PREPARING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To culture cells by sticking cells to arbitrary positions of a substrate in an arbitrary cell adhesion ratio and cell shape.

CONSTITUTION: An adsorption collagen 2 is formed in a striped pattern on the surface of a quartz plate 1.

Collagen is a cell bonding protein participating in adhesion of cell. Hepatic cells show an extended shape on collagen. Actually, when hepatic cells of grown rat are cultured by using the substrate for cell culture, almost all hepatic cells are bonded to the surface of the adhesion collagen 2 in comparison with the surface of quartz as shown by the figure.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.12.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 02.12.1997

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-176753

(43)公開日 平成5年(1993)7月20日

(51)IntCl ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/00	A	9050-4B		
C 1 2 N 5/06		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	E

審査請求 未請求 請求項の数17(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平3-357910

(22)出願日 平成3年(1991)12月26日

(71)出願人 000004237

日本電気株式会社
東京都港区芝五丁目7番1号

(72)発明者 赤池 敏宏

神奈川県横浜市緑区長津田町4259

(72)発明者 戸辺 成四郎

神奈川県高津区坂戸100-1 K S P東棟

(72)発明者 宮本 重幸

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社社内

(72)発明者 大橋 昭王

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社社内

(74)代理人 弁理士 菅野 中

(54)【発明の名称】 細胞培養用基板とその作製方法

(57)【要約】

【目的】 基板上の任意の位置に任意の細胞接着率や細胞形態で細胞を接着させて培養を行う。

【構成】 石英板1の表面には、吸着コラーゲン2が縞模様形成されている。コラーゲンは、細胞の接着に関与する細胞接着性タンパク質である。また、肝細胞は、コラーゲン上で伸展形態を呈する。実際に、この細胞培養用基板を用いて成熟ラット肝細胞の培養を行ったところ、図1(b)のように石英表面に比べ、吸着コラーゲン2の表面にほとんどの肝細胞が接着した。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、該基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を吸着させた表面部分を有しているものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項2】 細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの細胞接着性タンパク質である請求項1に記載の細胞培養用基板。

【請求項3】 細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、ポリ-N-ビニルベンジル-D-ラクトンアミドなどの細胞接着性高分子化合物である請求項1に記載の細胞培養用基板。

【請求項4】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、該基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質の種類、組成、吸着量を異ならせてそれぞれに吸着させた複数の表面部分を有しているものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項5】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去して基板の表面一部を露出させる工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を吸着させる工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有することを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項6】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、物質の種類、または組成、または吸着量が異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去して基板の表面一部を露出させる工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を吸着させる工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返すことを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項7】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を備えた表面部分を有するものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項8】 細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンによる細胞接着性タンパク質を架橋剤により処理して得られる膜である請求項7に記載の細胞培養用基板。

【請求項9】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着

させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜がその種類、または組成、または膜厚が異なる状態で形成されている複数の表面部分を有するものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項10】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、

該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を作製する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有することを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項11】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、膜の種類、または組成、または膜厚の異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、

該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を作製する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返すことを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項12】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を含むアルブミン架橋膜を備えた表面部分を有するものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項13】 細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンによる細胞接着性タンパク質である請求項12に記載の細胞培養用基板。

【請求項14】 細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、ポリ-N-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド等の細胞接着性高分子化合物である請求項12に記載の細胞培養用基板。

【請求項15】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板において、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を含むアルブミン架橋膜が物質の種類、または組成、または膜厚の異なる状態で形成されている複数の表面部分を有するものであることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項16】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、

該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質とアルブミンと架橋剤を含む溶液を塗布し製膜す

10

20

30

40

50

る工程と、

該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有することを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項 17】 一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、膜の種類、または組成、または膜厚の異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィ法により基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、

該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質とアルブミンと架橋剤を含む溶液を塗布し製膜する工程と、

該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返し行うことを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞培養用基板とその作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産等の目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。

【0003】 一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存させておくことができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの接着性タンパク質を均一に塗布したプラスチック製のペトリ皿が用いられている。

【0004】 これらの接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着率や接着形態に影響を与えることが知られている。

【0005】 さらに近年、ある細胞に特異的に作用する物質が種々見いだされている。例えば、肝臓の細胞を特異的に接着し、球形形態を維持させる働きをもつ、ガラクトース末端を有した人工基質材料ポリ-N-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド (PVL A) が合成され、肝細胞の培養に利用されている (人工臓器 vol. 19 No. 3 (1990) pp. 1156~1160)。

【0006】 一方、培養細胞を基板上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞のパターニングにおいて最も重要な技術は、細胞培養用基板の処理方法であり、現在いくつかの方法が試みられている。

【0007】 例えば、特開平 2-245181 号公報に

は、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用する例が示され、また、基板に親水あるいは疎水性なパターンを設けた例としては、光感受性の細胞非接着性親水性高分子をフォトリソグラフィ法によってパターニングして培養細胞の配列を試みた例が特開平 3-7576 号公報に紹介されている。

【0008】 さらに、細胞接着性の官能基を導入した例としては、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射して、細胞接着性基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって重合開始種を誘導し、この上に細胞接着性あるいは細胞非接着性モノマーを重合させた特開平 3-7577 号公報の例がある。

【0009】 基板表面に酵素膜などの機能性有機薄膜をパターニングする技術は、バイオセンサの製造において実現されている。例えば特願昭 59-209165 号の発明では、半導体イオンセンサの感応性部分にリフトオフ法によって酵素膜のパターニングを行っている。リフトオフ法は、センサの表面にフォトレジストを塗布する工程と、フォトリソグラフィにより酵素膜の形成を所望する部分のフォトレジストを除去する工程と、酵素膜を製膜する工程と、フォトレジストを溶解する工程とからなっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 従来の細胞培養用基板は、静電荷の有無や親水、疎水の差といったパターンを有しているが、この基板は、細胞が良く接着する表面と、ほとんど接着しない表面との二種類しか持たないため、これを用いて細胞を培養しても、細胞が接着するかどうかという単純なパターンしか得ることができない。すなわち、例えば、種々の細胞接着率を示す表面や、細胞の機能に大きく関与すると考えられる細胞の接着形態に影響を与える表面などの高機能な表面がパターンをなす細胞培養用基板は開発されていない。

【0011】 さらに、静電荷の有無や親水、疎水の差といった表面は、細胞の種類による選択性が低いので、従来の基板では複数の細胞を別々の表面に接着させることは困難であった。

【0012】 細胞培養用基板の作製法については、光感受性高分子を用いたフォトリソグラフィが検討されているが、細胞の接着率や形態に影響を与える物質をリフトオフ法を用いて直接パターニングした例はない。

【0013】 本発明の目的は、細胞の接着率や形態に影響を与える物質がパターニングされた細胞培養用基板及びその作製方法を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】 上記目的を達成するため、本発明による細胞培養用基板においては、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、該基板は、細胞の接着率や接着形態に

特異的に影響を与える物質を吸着させた表面部分を有しているものである。

【0015】また、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの細胞接着性タンパク質である。

【0016】また、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、ポリ-N-ビニルベンジル-D-ラクトンアミドなどの細胞接着性高分子化合物である。

【0017】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、該基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質の種類、組成、吸着量を異ならせてそれぞれに吸着させた複数の表面部分を有しているものである。

【0018】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を備えた表面部分を有するものである。

【0019】また、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンによる細胞接着性タンパク質を架橋剤により処理して得られる膜である。

【0020】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜がその種類、または組成、または膜厚が異なる状態で形成されている複数の表面部分を有するものである。

【0021】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板であって、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を含むアルブミン架橋膜を備えた表面部分を有するものである。

【0022】また、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンによる細胞接着性タンパク質である。

【0023】また、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質は、ポリ-N-ビニルベンジル-D-ラクトンアミド等の細胞接着性高分子化合物である。

【0024】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板において、基板は、細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を含むアルブミン架橋膜が物質の種類、または組成、または膜厚の異なる状態で形成されている複数の表面部分を有するものである。

【0025】また、本発明による細胞培養用基板の作製方法においては、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去して

基板の表面一部を露出させる工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を吸着させる工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有するものである。

【0026】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、物質の種類、または組成、または吸着量が異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去して基板の表面一部を露出させる工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質を吸着させる工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返すものである。

【0027】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を作製する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有するものである。

【0028】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、膜の種類、または組成、または膜厚の異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える膜を作製する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返すものである。

【0029】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質とアルブミンと架橋剤を含む溶液を塗布し製膜する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを有するものである。

【0030】また、一種類あるいは複数の接着性細胞を接着させて培養する細胞培養用基板の作製方法であって、膜の種類、または組成、または膜厚の異なる条件の下で基板にフォトレジストを塗布し、フォトリソグラフィにより基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、該基板に細胞の接着率や接着形態に特異的に影響を与える物質とアルブミンと架橋剤を含む溶液を塗布し製膜する工程と、該基板のフォトレジストを溶解する工程とを繰り返すものである。

【0031】

【作用】本発明の細胞培養用基板は、細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような物質が吸着していたり、このような物質を含んだアルブミン架橋膜を有したり、あるいは細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような膜

を有しており、種々の細胞接着率を示す表面や、細胞の接着形態に影響を与える表面などの、より高機能な表面がパターンを形成している。本基板を用いて細胞培養を行うことによって、基板上の任意の位置に任意の細胞接着率や接着形態で細胞を接着させ、培養を行うことができる。

【0032】また、本発明の基板は、細胞の種類に対して特異的なパターンを有するので、複数の細胞をこの上で培養することによって、複数の細胞を表面上の別々の位置に接着させることが可能になる。

【0033】また、本発明の細胞培養用基板の作製法は、フォトリソグラフィ法を用い、細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような物質や、このような物質を含んだアルブミン架橋膜や、細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような膜を、任意の位置に直接パターンニングすることができる。また、本発明による細胞培養用基板の作製法によれば、フォトレジストを用いたリフトオフ法を採用しているため、光感受性物質に限らず、いろいろな種類の物質のパターンニングに応用が可能である。

【0034】

【実施例】次に本発明の実施例について図面を参照して説明する。図1(a)は、本発明の細胞培養用基板の一実施例を示した図である。

【0035】基板本体は、厚さ0.5ミリメートルの石英板1である。基板の表面は石英と吸着コラーゲン2からなり、基板表面に、コラーゲン吸着面が幅100マイクロメートル、間隔200マイクロメートルで縞模様を形成している。コラーゲンは、細胞の接着に関与する細胞接着性タンパク質である。また、肝細胞は、コラーゲン上で伸展形態を呈する。

【0036】図1(b)は、この細胞培養用基板を用いて成熟ラット肝細胞の培養を行った後の基板の表面状態を示すものである。培養は、Williams' E培地を用いて37℃、5%炭酸ガスの雰囲気中で48時間行った。石英表面に比べ、吸着コラーゲン2の表面にほとんどの肝細胞が接着した。さらに、接着している細胞は、伸展形態を示しており、コラーゲン吸着面が本来のコラーゲンの性質を持った状態で形成されていることがわかる。

【0037】図2は、本発明の細胞培養用基板の実施例1の別の例を示した図である。石英板1の表面部分には、吸着PVL A3が縞模様を形成している。この模様は、縞の幅が4マイクロメートルずつ広がり、縞の間隔が4マイクロメートルずつ狭まり、隣合う縞の幅と間隔との和が100マイクロメートルとなるように形成されている。PVL Aは、肝細胞を特異的に接着する人工基質材料で、肝細胞はPVL A上で集合形態を示す。

【0038】細胞培養用基板本体の材質は、ガラスや石英、シリコン等の金属、ポリスチレン等のプラスチックを使用できる。特に、透明なガラス、石英やポリスチレ

ンは、透過型の生物顕微鏡で培養細胞の観察を行うことができる点で適している。

【0039】細胞培養用基板に吸着させる物質は、上の例に示したコラーゲンやPVL A3に限られず、基板に接着した培養細胞に特異的に影響を与え、かつ基板に吸着する性質を有していれば良い。

【0040】例えば、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等の細胞接着性タンパク質や、グルコースやマルトースといったオリゴ糖鎖を側鎖に有するポリスチレン誘導体などの細胞接着に関与する人工基質材料、ガラクトサン、マンナンやムコ多糖などの多糖類が挙げられる。その他、牛血清アルブミンなどのタンパク質、ポリリシンやポリグルタミン酸などのポリアミノ酸も使用できる。

【0041】図3は、本発明の細胞培養用基板の実施例2を示した図である。石英板1の表面部分に、グルタルアルデヒドによって架橋させたコラーゲン膜4が格子模様で設けられている。この模様は、基板の縦方向、横方向とも、縞の幅が4マイクロメートルずつ広がり、縞の間隔が4マイクロメートルずつ狭まり、隣合う縞の幅と間隔との和が100マイクロメートルとなるように形成されている。

【0042】細胞培養用基板に設ける膜は、上の例の他に、架橋剤で架橋させたフィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等の細胞接着性タンパク質の膜が挙げられる。

【0043】図4は、本発明の細胞培養用基板の実施例3を示した図である。石英板1の表面部分に、コラーゲンを含むアルブミン架橋膜5が一辺200マイクロメートルの市松模様で設けられている。

【0044】細胞培養用基板に設けるアルブミン架橋膜5は、培養細胞に特異的に影響を与えるような物質を包含していれば良い。培養細胞に特異的に影響を与える物質としては、実施例1で述べた、細胞培養用基板に吸着させる物質を用いることができる。

【0045】図5は、本発明の細胞培養用基板の実施例4を示した図である。石英板1の表面部分に、コラーゲンを含むアルブミン架橋膜5が直径100マイクロメートルの円形の島状に、間隔200マイクロメートルで並んでおり、その他の部分にはPVL Aを含むアルブミン架橋膜6が塗布されている。

【0046】このように、異なる物質を包含したアルブミン架橋膜6が塗布された表面を組み合わせた細胞培養用基板も有用であり、また、異なる物質が吸着した表面を組み合わせた細胞培養用基板や、異なる膜が塗布された表面を組み合わせた細胞培養用基板も同じく有用であることは明らかである。さらに、細胞に特異的に影響を与える物質が吸着した表面やこの物質を含むアルブミン架橋膜、細胞に特異的に影響を与える膜を各々組み合わせることもできる。

【0047】図6(a)～(d)は、本発明の細胞培養用基板の製造方法の第1の実施例を示した作製工程断面図である。以下に作製工程を順に説明する。まず、清浄な石英板1を基板としてその上に、図6(a)のようにフォトリソグレイ7をスピン塗布し、乾燥させた。

【0048】この際、ヘキサメチルジシラザン等のフォトリソグレイの密着性を向上させる試薬によって、予め基板を前処理しておいても良い。次に、この基板にフォトリソマスクを通して水銀ランプを照射した後現像処理を行い、図6(b)のようにフォトリソグレイをパターンニングした。続いて、0.3mg/mlの酸性コラーゲン水溶液に10分間浸漬後水洗し、図6(c)のようにコラーゲンを吸着させた。

【0049】この際、石英板1への吸着コラーゲン2の定着を確かなものにするために、表面を疎水化するような試薬によって予め基板を前処理しておいても良い。このような目的で使用される試薬としては、例えば、ジメチルポリシロキサンなどの高分子化合物や、オクタデシルトリエトキシシランなどのシランカップリング剤が挙げられる。最後に有機溶媒でフォトリソグレイを溶解後、水洗して図6(d)のような細胞培養用基板を得た。

【0050】以上の実施例において、細胞培養用基板に吸着させる物質は、上の例に示したコラーゲンに限られず、基板に接着した培養細胞に特異的に影響を与え、かつ基板に吸着する性質を有する物質であれば適用できる。この実施例によれば、培養細胞に特異的に影響を与える物質を基板に高密度に導入することができる。

【0051】図7(a)～(d)は、本発明の細胞培養用基板の製造方法の第2の実施例を示した作製工程断面図である。以下に作製工程を順に説明する。まず、清浄な石英板1に図7(a)のようにフォトリソグレイ7をスピン塗布し、乾燥させた。

【0052】この際、ヘキサメチルジシラザン等のフォトリソグレイの密着性を向上させる試薬によって、予め基板を前処理しておいても良い。次に、この基板にフォトリソマスク2を通して水銀ランプを照射した後、現像処理を行い、図7(b)のようにフォトリソグレイをパターンニングした。

【0053】続いて、1%グルタルアルデヒドを含む1.5mg/mlのコラーゲン水溶液をスピン塗布し、一時間室温で放置して架橋反応を進めた後水洗し、図7(c)のようにコラーゲン架橋膜4を設けた。この際、石英板1へのコラーゲン架橋膜4の密着性を向上させるために、3-アミノプロピルトリエトキシシランなどを用いて、予め基板を前処理しておいても良い。最後に有機溶媒でフォトリソグレイを溶解後水洗して図7(d)のような細胞培養用基板を得た。

【0054】本実施例において、細胞培養用基板に設ける膜としては、上の例に示したコラーゲン架橋膜の他に、細胞接着性タンパク質を架橋剤で架橋させた膜を用

いることができる。

【0055】図8(a)～(d)は、本発明の細胞培養用基板の製造方法の第3の実施例を示した作製工程断面図である。以下に作製工程を順に説明する。まず、清浄な石英板1に図8(a)のようにフォトリソグレイ7をスピン塗布し、乾燥させた。この際、ヘキサメチルジシラザン等のフォトリソグレイの密着性を向上させる試薬によって、予め基板を前処理しておいても良い。次に、この基板にフォトリソマスクを通して水銀ランプを照射した後現像処理を行い、図8(b)のようにフォトリソグレイをパターンニングした。

【0056】続いて、0.14%コラーゲン、1%グルタルアルデヒドを含む15%牛血清アルブミン水溶液をスピン塗布し、一時間室温で放置して架橋反応を進めた後水洗し、図8(c)のようにコラーゲンを含むアルブミン架橋膜5を設けた。この際、石英板1へのアルブミン架橋膜5の密着性を向上させるために、3-アミノプロピルトリエトキシシランなどを用いて、予め基板を前処理しておいても良い。

【0057】最後に有機溶媒でフォトリソグレイを溶解後水洗して図8(d)のような細胞培養用基板を得た。本実施例において、細胞培養用基板に設けるアルブミン架橋膜が包含する物質としては、上の例に示したコラーゲンに限られず、基板に接着した培養細胞に特異的に影響を与える物質であれば適用できる。本実施例では、アルブミン架橋膜に包括し、固定化するので、基板へ吸着する性質が乏しいような物質でも細胞培養用基板に導入できる長所を有している。

【0058】本発明による細胞培養用基板の作製方法は、以上実施例に示した各工程を繰り返すあるいは組み合わせることによって、異なる機能を有する複数の表面を持った細胞培養用基板を作製することができる。例えば、コラーゲンを吸着した表面部分とPVL Aを含むアルブミン膜とを備えた表面部分を有する細胞培養用基板の作製が可能である。

【0059】

【発明の効果】以上説明した通り、本発明の細胞培養用基板によれば、細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような物質、膜及びアルブミン架橋膜のパターンを有しているので、基板上の任意の位置に任意の細胞接着率や細胞形態で細胞を接着させて培養を行うことができ、複数の細胞を表面上の別々の位置に接着させることも可能である。

【0060】また、本発明の細胞培養用基板の作製方法によれば、フォトリソグラフィー法を利用することによって、細胞の接着率や接着形態に影響を与えるような物質、膜及びアルブミン架橋膜を任意の位置にパターンニングできる。

【0061】また、本発明は、フォトリソグレイを用いたリフトオフ法を採用しているため、いろいろな種類の物

質をパターンニングに応用できる。すなわち、本発明を利用することにより、細胞の接着位置だけでなく、細胞の活性や機能の制御も可能となることから、培養細胞の人工臓器やバイオセンサへの応用が容易になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】(a)は、各々本発明による細胞培養用基板の一実施例を示す平面図及び平面図のA-A線断面図、(b)は、この細胞培養用基板を用いて成熟ラット肝細胞の培養を行った後の基板の表面を示す顕微鏡写真である。

【図2】本発明による細胞培養用基板の別の一実施例を示した図である。

【図3】本発明による細胞培養用基板のさらに別の一実施例を示した図である。

【図4】本発明による細胞培養用基板のさらに別の一実施例を示した図である。

10

* 【図5】本発明による細胞培養用基板のさらに別の一実施例を示した図である。

【図6】(a)～(d)は、本発明による細胞培養用基板の製造方法の一実施例を示した図である。

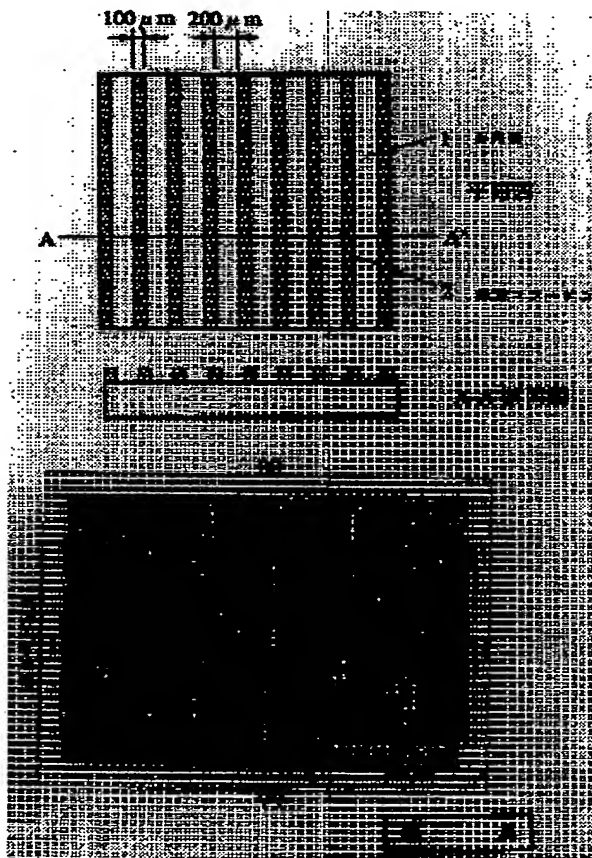
【図7】(a)～(d)は、本発明による細胞培養用基板の製造方法の別の一実施例を示した図である。

【図8】(a)～(d)は、本発明による細胞培養用基板の製造方法のさらに別の一実施例を示した図である。

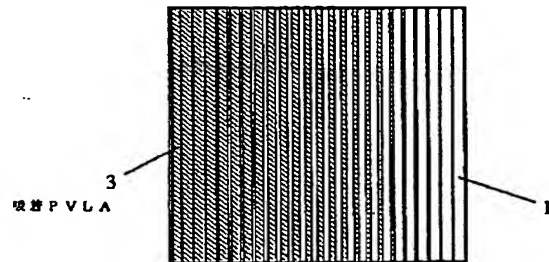
【符号の説明】

- 1 石英板
- 2 吸着コラーゲン
- 3 吸着PVL A
- 4 コラーゲン膜
- 5 コラーゲンを含むアルブミン架橋膜
- 6 PVL Aを含むアルブミン架橋膜
- 7 フォトレジスト

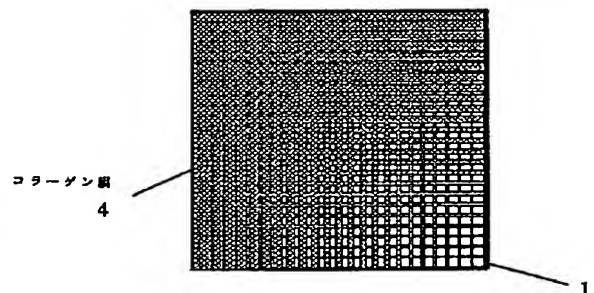
【図1】



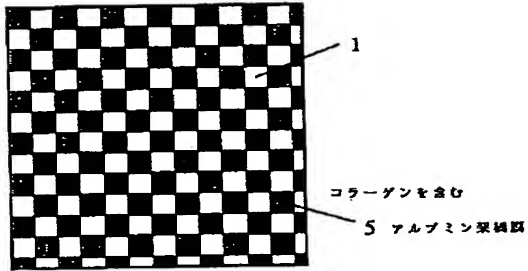
【図2】



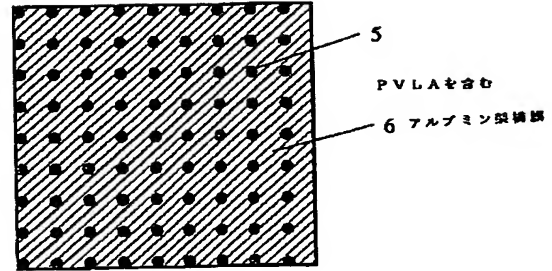
【図3】



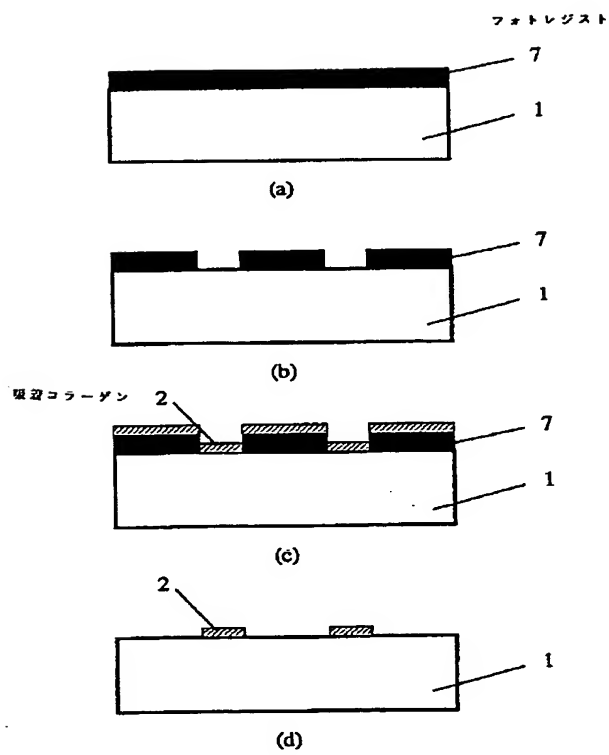
【図4】



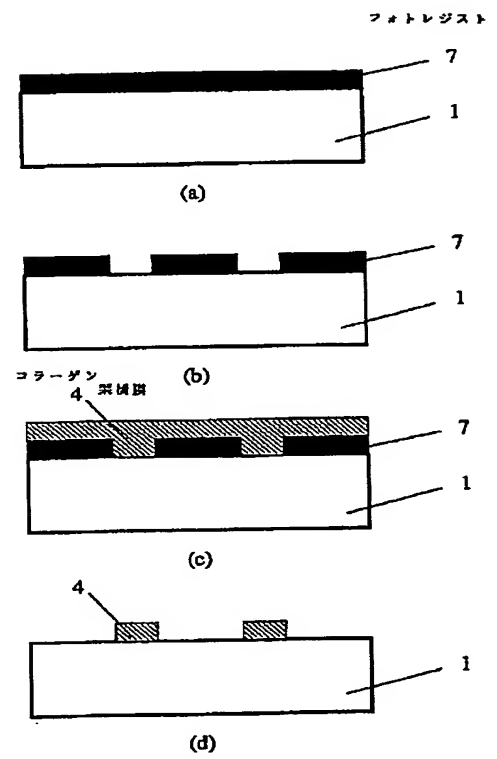
【図5】



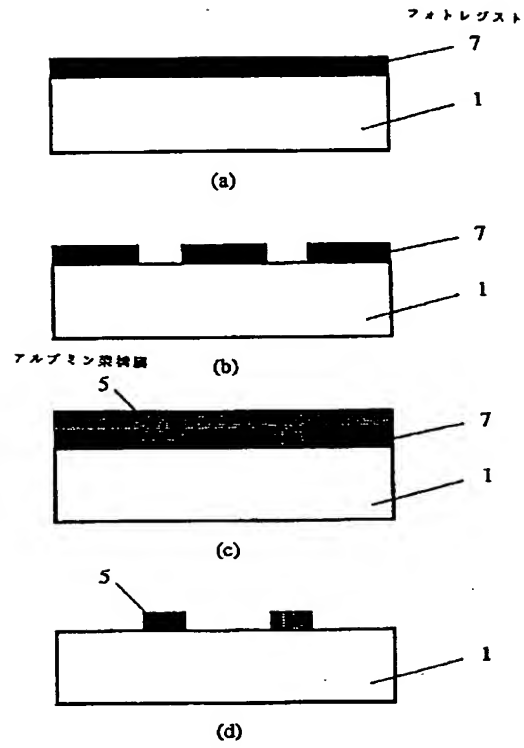
【図6】



【図7】



【図8】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.